

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-047500

(43)Date of publication of application : 07.03.1986

(51)Int.Cl.

C07K 15/04  
A61K 39/395  
C12N 15/00  
C12P 21/00  
G01N 33/577  
//(C12N 15/00  
C12R 1:91 )  
(C12P 21/00  
C12R 1:91 )

(21)Application number : 59-169370

(71)Applicant : RES DEV CORP OF JAPAN

(22)Date of filing : 15.08.1984

(72)Inventor : TANIGUCHI KATSU  
KUROSAWA YOSHIKAZU  
SUGITA KOZO

## (54) CHIMERA MONOCLONAL ANTIBODY AND ITS PREPARATION

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A chimera monoclonal antibody consisting of a variable region originated from an animal other than human, and a constant region originated from human.

USE: A monoclonal antibody giving low side effects such as anaphylactic shock and serum diseases when administered to human body.

PREPARATION: The objective chimera monoclonal antibody can be produced by separating active VH and VL genes from an antibody-producing cell of an animal other than human and CH and CL genes from human DNA, inserting the genes into a manifestation vector, and introducing the vector to a cultured animal cell.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

AQY  
00845

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑬ 公開特許公報(A)

昭61-47500

⑭ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑮ 公開 昭和61年(1986) 3月7日

C 07 K 15/04  
A 61 K 39/395  
C 12 N 15/00  
C 12 P 21/00  
G 01 N 33/577  
/(C 12 N 15/00  
C 12 R 1:91)  
(C 12 P 21/00  
C 12 R 1:91)

6464-4H  
7043-4C  
7115-4B  
7235-4B  
7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 2 (全 10 頁)

⑯ 発明の名称 キメラモノクローナル抗体及びその製造法

⑰ 特 願 昭59-169370

⑱ 出 願 昭59(1984) 8月15日

⑲ 発 明 者 谷 口 克 千葉市小仲台3-17-12  
⑲ 発 明 者 黒 沢 良 和 名古屋市昭和区天白町八事富士見丘20-1 ライオンズマ  
ンション八事ガーデン2-215  
⑲ 発 明 者 杉 田 幸 三 名古屋市千種区日岡町1丁目60 相南荘  
⑲ 出 願 人 新技術開発事業団 東京都千代田区永田町2丁目5番2号  
⑲ 代 理 人 弁理士 田 中 宏

明 細 書

1 発明の名称

キメラモノクローナル抗体及びその製造法

2 特許請求の範囲

- (1) ヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域からなるキメラモノクローナル抗体
- (2) ヒト以外の動物としてマウスである特許請求の範囲第1項記載のキメラモノクローナル抗体
- (3) ヒト以外の動物としてラットである特許請求の範囲第1項記載のキメラモノクローナル抗体
- (4) ヒト以外の動物の抗体産生細胞から単離した活性なV<sub>H</sub>とV<sub>L</sub>遺伝子及びヒトDNAから単離したC<sub>H</sub>とC<sub>L</sub>遺伝子を発現ベクターに挿入し、動物培養細胞に導入してキメラモノクローナル抗体を生産することを特徴とするヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域とからなるキメラモノクローナル抗体の製造

方法

- (5) 抗体産生細胞としてハイブリドーマ、エプスタインバーウイルスによる形質転換B細胞またはクローン化B細胞を用いる特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法
- (6) ベクターとしてpSV2-gpt, pSV2-neo, SV40からなる群から選ばれたベクターを使用することからなる特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法
- (7) 動物培養細胞がヒト、サル、マウス等の動物に由来するリンパ腫、腎細胞、L細胞、CoS細胞、HeLa細胞の何れか一種を使用する特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法

3 発明の詳細な説明

本発明はキメラモノクローナル抗体及びその製造法に関し、特に人体に投与した場合にアナフィラキシーショックや血清病などの副作用の少ないモノクローナル抗体及びその製造法に関する。

単一抗原決定基だけを認識するモノクローナル抗体は免疫学全体に大きな影響を与え、その有用性は医学界にとゞまらず生物学、薬学、化学などの多くの分野で証明されている。そして、このモノクローナル抗体を得る方法に関しては1975年 Köhlerと Milstein がヒツジ赤血球で免疫したマウスの脾細胞とマウスミエロマ細胞とを細胞融合させることで実現し (Nature 256 495-497 (1975))、この外エプスタイン-バー (Epstein-Barr) ウイルスによる方法などがある (特開昭58-201723号参照)。しかし、これらのモノクローナル抗体の多くはそれ自体がマウス等人間以外の動物に由来するためそれを人間に投与した場合には異種蛋白を注射することになり、その結果、アナフィラキシーショックや血清病などの副作用がみることが予想される。そのため、ヒトハイブリドーマを用いてヒトモノクローナル抗体を作成する試みがなされている。(例えば特開昭57-126424、特開昭57-502090、特開昭58-90817、特開昭

-3-

動物の抗体産生細胞から単離した活性な  $V_H$  と  $V_L$  遺伝子及びヒト DNA から単離した  $O_H$  と  $O_L$  遺伝子を発現ベクターに挿入し動物培養細胞に導入してキメラモノクローナル抗体を産生させることからなる。ここで「活性な  $V_H$  と  $V_L$  遺伝子」とは抗体産生細胞において DNA の再配列によつて出来た  $V_H$  にもつては  $V-D-J$ 、 $V_L$  にもつては  $V-J$  構造を有する機能的な遺伝子である。しかし、本発明においてヒト以外の動物としてはマウス、ラット、サル、羊、ウサギ等であり、また、抗体産生細胞としては好ましくはハイブリドーマ、クローン化 B 細胞或はエプスタイン-バーウイルスによる形質転換 B 細胞を用いることが望ましく、発現ベクターとしては pSV2-gpt, pSV2-neo, SV40 が好適である。動物培養細胞には、ヒト、サル、マウス等の動物に由来するリンパ腫、腎細胞、L 細胞、O68 細胞、HeLa 細胞の何れかを用いることができる。

しかし、本発明に従えばヒト以外の動物は自由に免疫できるので容易に所望のキメラモノクローナル抗体を得ることができると共に、人間に投

与した場合は動物由来のモノクローナル抗体に比して異種蛋白による抗原性が著しく軽減されることが期待される。

次に実施例をもつて本発明を説明する。  
実施例  
マウス V 遺伝子の単離  
腫瘍細胞 P3U1 と O57BL/6 マウスに自然発生した黒色腫瘍細胞で免疫した O57BL/6 マウスに由来する脾臓細胞との融合細胞であるハイブリドーマ D10 株 (注、正式には M2590 株である。) は黒色腫瘍細胞と選択的に反応する抗体を分泌し、この抗体のタイプは H 鎖については IgM 型で、L 鎖については  $\mu$  である。先づ D10 株、P3U1 株及び O57BL/6 マウス腎臓から DNA を単離す (Cell 24 353-356 (1981) 参照) 次に 10 ng の DNA を制限酵素 HindIII と EcoRI で切断する。制限酵素の HindIII で切断した D10 株と P3U1 株及び O57BL/6 マウス腎臓の DNA を電気泳動で 0.9 % のアガロースゲルに展開し、トロセルロース膜 (Schleicher and Schuell, J. Mol. Biol. 98 503

-4-

与した場合動物由来のモノクローナル抗体に比して異種蛋白による抗原性が著しく軽減されることが期待される。

次に実施例をもつて本発明を説明する。

#### 実施例

##### マウス V 遺伝子の単離

腫瘍細胞 P3U1 と O57BL/6 マウスに自然発生した黒色腫瘍細胞で免疫した O57BL/6 マウスに由来する脾臓細胞との融合細胞であるハイブリドーマ D10 株 (注、正式には M2590 株である。) は黒色腫瘍細胞と選択的に反応する抗体を分泌し、この抗体のタイプは H 鎖については IgM 型で、L 鎖については  $\mu$  である。先づ D10 株、P3U1 株及び O57BL/6 マウス腎臓から DNA を単離す (Cell 24 353-356 (1981) 参照) 次に 10 ng の DNA を制限酵素 HindIII と EcoRI で切断する。制限酵素の HindIII で切断した D10 株と P3U1 株及び O57BL/6 マウス腎臓の DNA を電気泳動で 0.9 % のアガロースゲルに展開し、トロセルロース膜 (Schleicher and Schuell, J. Mol. Biol. 98 503

-5-

-1152-

-6-

〜515(1975)参照)に転写し、一方は領域を含んだ2.7 Kb HindIII-HindIII断片に相当する(利根川進氏より得た。Nature 280:288-294(1979)参照)J<sub>κ</sub>プロンプ(10<sup>7</sup> cpm/0.1 DNA)を用いたハイブリダイゼーションを行ったその結果を図1A(a)に示す。

ところで図1A(a)より明らかなようにD10株のDNAは6.5, 6.3及び6.1 Kbの3つの再配列したバンドが存在する。これらのうち6.3及び6.1 KbはP3U1DNAに見られるものと同様のものである。6.5 KbのバンドはV<sub>κ</sub>-J<sub>κ</sub>構造を含む活性な遺伝子であり、その特異性の発現に関与する遺伝子である。分子サイズはλファージのHindIIIマーカーによつて見積つた。このサイズに相当するDNA断片をアガロース電気泳動により単離し、λファージHindIIIベクターλ788(K. Murray氏(エジンバラ大学)より得た。Molec. Gen. Genet., 150:53-61(1977)参照)に挿入し、λファージにパッケージした。パッケージミクスチャーには大腸菌BH82688とBHB2690を用いた。(Hehn.

-7-

クローンVJ<sub>κ</sub>14は機能的なV<sub>κ</sub>-J<sub>κ</sub>構造を含んでいる。

ノーザンハイブリダイゼーションの方法は免疫実験操作法XII(1983)に記載されている。

また、図1A(c)は0.9 KbのXbaI-EcoRI断片に相当するJ<sub>H</sub>プロンプ(Cell 24:353-365(1981)参照)とEcoRIで切断したDNAのサザンハイブリダイゼーションを示す。先に述べた理由を基にD10株DNAにだけ探索される5.5 KbのDNAを機能的なH鎖のV領域遺伝子を含む断片λファージEcoRIベクターであるλgtWES-λB(P. Leder, Science 196:175-177(1977)参照)を用いてクローン化し、クローンVJ<sub>H</sub>243を得た。クローンVJ<sub>H</sub>243とMEP203(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2138-2142(1980)参照)の1.0 KbのEcoRI断片に相当するO<sub>κ</sub>プロンプを用いた。D10株のmRNAとノーザンブロットングを行った結果、2.4 Kbの位置にバンドを見つけた(図1A(d)参照)。クローンVJ<sub>κ</sub>14とVJ<sub>H</sub>243に含ま

-9-

B. Meth. Enzymol 68:299-309(1979)参照)次にJ<sub>κ</sub>プロンプをスクリーニングに用いベンソンダイビス法(Science 196:180-182(1977)参照)にしたがつてプラークハイブリダイゼーションを行いクローンVJ<sub>κ</sub>14を単離した。このクローンの制限酵素地図を表1B(d)に示す。このクローンVJ<sub>κ</sub>14のHindIII挿入断片をノーザンハイブリダイゼーションを行うために単離した。

D10株からグアニジウムチオシアネート法(Biochemistry 18:5294-5299(1979)参照)により全RNAを分離し、オリゴdTセルロースカラムの未通り画分からポリA構造をもつmRNAを得た。図1A(b)はD10株のmRNAと、クローンVJ<sub>κ</sub>14のHindIII挿入断片或はO<sub>κ</sub>領域を含む3Kb HindIII-BamHI断片(利根川進氏より得た。Nature 280:288-294(1979)参照)に相当するO<sub>κ</sub>プロンプとのノーザンハイブリダイゼーションを示している。J<sub>κ</sub>とO<sub>κ</sub>の両プロンプにより1.2 Kbの位置にバンドが見つかった。

-8-

れる活性なV遺伝子が特異性の発現に関与する。

#### ヒトO遺伝子の単離

ヒトの血漿の中で主要な免疫グロブリンクラスであるIgGの定常領域の遺伝子を単離する。すなわちヒトの免疫グロブリン遺伝子の塩基配列はマウスのそれと高い相同性を示しているので、ヒトのゲノムに存在する例えばO<sub>κ</sub>とOri遺伝子をそれに相当するマウスの遺伝子をプロンプとして用いて単離するのであつて、その方法はクローンIg146(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4709-4713(1978)参照)からの3KbのHindIII-BamHI断片とクローンMEP10(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:474-478(1981)参照)からの5.8KbのEcoRI断片をプロンプとして用いヒトのラムダcheron 4AのHaeIII-AluI遺伝子ライブラリー(T. Nishitani, Cell 15:1157-1174(1978)参照)の中からヒトO<sub>κ</sub>遺伝子を含みエンハンサー領域を保持している断片を単離する。Ori遺伝子はヒト胎子単細胞DNAをHindIIIで切断しアガロースゲル電気泳動で大き

-10-

さにしたがつて分離したのち 5.9 Kb のバンドを 1788 に挿入し前記のプロープを用いてクローン化した。単離したクローンは図 1 B(c) の H0#2 と (d) の HG163 である。

V<sub>ε</sub> (マウス) 遺伝子と O<sub>ε</sub> (ヒト) 遺伝子を含むプラスミド pSV2-HO<sub>ε</sub>V<sub>D10</sub> 作成

エンハンサーを保持したヒト O<sub>ε</sub> 遺伝子を含む 1.9 Kb の Pvu II 断片を図 1 B(c) に示すクローン H0#2 から単離し等量混合した Hind III と BamHI リンカー (宝酒造製) を結合したのち Hind III で切断する。この断片を図 1 B(c) に示す VJ<sub>ε</sub>14 から単離した 6.5 Kb の Hind III 挿入断片と結合し、BamHI で切断する。得られた断片を分別シブガロースゲル電気泳動により 5.9 Kb の断片を単する。この断片を pSV2gpt の BamHI 部位に挿入する。挿入した遺伝子の方向は、制限地図により決定する。(図 2 pSV2-HO<sub>ε</sub>V<sub>D10</sub> 参照)

V<sub>H</sub> (マウス) 遺伝子と OrI (ヒト) 遺伝子を含むプラスミド pSV2-HG1V<sub>D10</sub> 作成

8.2 Kb の Hind III 挿入断片を HG163 クローン

-11-

- 室温で 30 分間保温する。
- P3U1 株をトリプシン処理し、細胞をばらばらにした後 10% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地を加えトリプシン処理を終了させる。
- 培養液を 1,500 rpm 5 分間遠心して細胞を集める。
- 牛胎児血清を含まない培地に  $2 \times 10^7$  個の細胞を滴下する。
- 1,500 rpm で 5 分間遠心する。
- 直接、1 の液 10 ml に浮遊する。
- 37℃ で 30 分間保温する。
- 5 ml を別の試験管に移す。
- 10% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 の培地をそれぞれ 4.5 ml ずつ加える。
- 96 穴プレートにそれぞれ 0.1 ml ずつ  $2 \times 10^4$  個の細胞が入る様に分注する。
- 72 時間 <sup>RP</sup> RPMI 1640 - 10% 牛胎児血清培地で培養する。
- その後 5 μg/ml のミコフエノール酸と

-13-

から単離し、Klenov 酵素により両端の一本鎖部分を消化し、その両端に EcoRI リンカー (宝酒造製) を接続した。その断片を EcoRI と BamHI で切断し EcoRI と BamHI で開環したプラスミド pSV2gpt に挿入し、ヒト OrI 遺伝子を含む pSV2-HG14 クローンを得る。5.5 Kb の EcoRI 断片をクローン VJ<sub>H</sub> 243 から単離し pSV2-HG14 の EcoRI 切断位置に挿入する。挿入した遺伝子の方向に制限地図により決定した。(図 2b pSV2-HG1V<sub>D10</sub> 参照)

プラスミド pSV2-HO<sub>ε</sub>V<sub>D10</sub> 及び pSV2-HG1V<sub>D10</sub> による形質細胞腫の形質転換

pSV2-HO<sub>ε</sub>V<sub>D10</sub> と pSV2-HG1V<sub>D10</sub> の両 DNA をカルシウム、リン酸共沈降法 (proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 1373-1376 (1979 参照) に) よりプラスマサイトーマ (形質細胞腫) P3U1 株 (H 鎖は合成しないが L 鎖を生産する性質を持つ) に導入した。その方法は次のとおりである。

1. A 溶液をそれと等量の 2xHeBS 溶液に滴下する。

-12-

2. 5.0 μg/ml のキサンテンを含む <sup>RP</sup> RPMI 1640 - 10% 牛胎児血清培地にとりかえ、形質転換した細胞を選択する。

しかして、A 溶液及び 2xHeBS 溶液は次のよう

A 溶液

pSV2-HG1V <sub>D10</sub>	1140 μL	(プラスミド 200 μg 含有)
pSV2-HO <sub>ε</sub> V <sub>D10</sub>	900 μL	( " )
2 M <sup>CaCl<sub>2</sub></sup> <del>CaCl<sub>2</sub></del>	312.5 μL	(オートクレーブ)
再蒸留水	2647 μL	(で滅菌したもの)
2xHeBS 溶液	pH 7.05	
HEPES	10 g/L	
NaCl	16 g/L	
KCl	0.74 g/L	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.25 g/L	
dextrose	2 g/L	

キメラモノクローナル抗体産生形質転換細胞の選別

-1154-

-14-

キメラモノクローナル抗体産生形質転換細胞の選別には酵素免疫、蛍光抗体法、或はセルソーター (FACS) (ベクトン・ダシグソン社) による解析を用いた。ミコフエノール酸を含む選択培地により18の形質転換細胞クローンが選別された。P3U1株とこれら18の形質転換細胞はプレート中に十分増殖するまで選択培地で育てた。これらの細胞の培養上清を酵素免疫蛍光抗体法 (Meth. Enzymol. 70 419-429 (1980) 参照) によつて抗体の産生状態を試験した。その結果を表1に示す。

表 1

抗体細胞	ウサギ抗ヒトIgG抗体	ウサギ抗ヒトC $\alpha$ 抗体
HMH-S1	-	-
HMH-S6	-	-
HMH-S7	+	+
HMH-S8	-	-
HMH-S18	-	-

-15-

最後に10<sup>6</sup>個の細胞を1mlの培養液に浮遊させ、対数増幅器付きのFA08 IV (ベクトン・ダシグソン社) で解析した。その結果を図3に示す。図3(a), (b), (c) は微細細胞としてHMH細胞を用いウサギIgGの反応をコントロールとし、それぞれ(a)はウサギの抗ヒトIgG抗体、(b)はウサギの抗ヒト $\alpha$ 抗体、(c)はウサギの抗ヒトIgG抗体との反応を表わし、(d), (e), (f)はHMH細胞とP3U1細胞に対するそれぞれ(d)はウサギの抗ヒトIgG抗体、(e)はウサギの抗ヒト $\alpha$ 抗体、(f)はウサギの抗ヒトIgG抗体の反応を表わす。

#### HMH細胞に導入されたDNAの解析

HMH細胞から前述の方法によりDNAとポリA構造を含むRNAを単離する。HMH細胞のDNAと同様に単離したO57BL/6腎臓細胞とP3U1細胞のDNAをBamHIで切断しJ $\alpha$ (マウス)プロンプ (表4A-(a))、O $\alpha$ (ヒト)プロンプ (表4A-(b))、J $\mu$ (マウス)プロンプ (表4A-(c)) 及びO $\gamma$ (ヒト)プロンプ (表4A-(d))を用いサザンハイブリダイゼーションを行う。

-17-

HMH-S7は1×10<sup>7</sup>個の細胞が10mlの培養上清に約100 nF/mlのマウス・ヒトキメラモノクローナル抗体を産生している。

#### 抗ヒトIgGを用いたHMH細胞とP3U1のセルソーター解析

HMH細胞とP3U1株はHank'sの平衡塩類溶液 (Gibco) で2度洗浄し10<sup>7</sup>個の細胞を750 $\mu$ Lの染色緩衝液 (1%, FCS-RPM10 11.6.4.0) と250 $\mu$ Lのウサギ抗ヒト免疫グロブリン抗体又は正常ウサギIgG (1 nF/ml) の混合液に浮遊させ、1時間室温で保温した。その後細胞を3度洗浄した。その後の手順はベクター・ラボラトリ社のアビジンビオチンキット (avidin-biotin kit) に示されているものと同様である。要領としては細胞を予めヒトIgGで吸収処理したビオチン結合抗ウサギIgG (1.5 nF/ml) 200倍希釈溶液250 $\mu$ Lに浮遊し、1時間、室温で保温した後、Hank's溶液で3度洗浄し、250 $\mu$ Lの20倍希釈アビジンFITC (5 nF/ml) に浮遊させ室温で30分間保温し、Hank's溶液で3度洗浄する。

-16-

ヒトO $\alpha$ とマウスJ $\mu$ プロンプはpSV2-HO $\alpha$ VD<sub>1</sub>のBamHI挿入断片のサイズに相当する5.9 KbのバンドをHMH細胞のDNA中に探索した。マウスJ $\mu$ プロンプはpSV2-HGIVD<sub>1</sub>のV $\mu$ 遺伝子を含むEcoRI挿入断片に相当する5.5 KbのバンドをHMH細胞のDNA中に探索した。ヒトO $\gamma$ 1プロンプはpSV2-HGIVD<sub>1</sub>のO $\gamma$ 1遺伝子を含むEcoRI-BamHI挿入断片をHMH細胞のDNA中に探索した。これらによりHMH細胞にはゲノム中に完全なH鎖とL鎖のキメラ遺伝子を保持していることが示された。

HMH細胞より単離したポリA構造をもつmRNAとP3U1より単離したポリA構造をもつmRNAをそれぞれVJ $\mu$ 14プロンプ、ヒトO $\alpha$ プロンプ、VJ $\mu$ 243プロンプ及びヒトO $\gamma$ 1プロンプとの間でノーザンブロッティングを行った。VJ $\mu$ 14プロンプとヒトO $\alpha$ プロンプにより通常K鎖を産生している細胞にみられるのと同じサイズに相当する1.2 Kbのバンドがキメラ抗体のL鎖のmRNAとして探索され、HMH細胞のmRNA中に

-1155-

-18-

最初に転写されたもので、またスプライシングされていないためイントロンがとり除かれていない mRNA が 5 Kb のバンドとして探索される。(図 4 B (a) (b) 参照) VJH243 として Orl プロープにより H M H 細胞の mRNA 中に 3.5 Kb と 7 Kb のバンドが探索され、3.5 Kb のバンドは成熟結合型の r H 鎖の mRNA のサイズに相当し、7 Kb のバンドは最初に転写されイントロンがとり除かれていない mRNA に相当する。

以上により H M H 細胞中でマウス由来の V-(D)-J エクソンとヒト由来 O エクソンの間で最初に転写された mRNA のスプライシングが部分的に起っていることが証明された。

#### 4. 図面の簡単な説明

図 1 A は活性化マウス V 遺伝子とヒトの O 遺伝子を単離するためのサザンハイブリダイゼーション及びそれらの mRNA のノーザンブロットングの解析結果を示す X 線写真

B は単離したクローンの制限酵素地図

図中 E<sub>h</sub> はエンハンサー、H は Hind III、



B は BamHI、E は EcoRI、P は pvuII を表わす

図 2 は DNA 形質転換に用いるために作成したプラスミド構造

- a) プラスミド pSV2-HO<sub>2</sub>V D10 の構造
- b) プラスミド pSV2-HGIV D10 の構造

図 3 はセルソーター解析図

図 4 A は H M H 細胞の DNA のサザンハイブリダイゼーション

B は H M H 細胞の mRNA のノーザンブロットング解析結果を示す X 線写真

出 願 人 新技術開発事業団

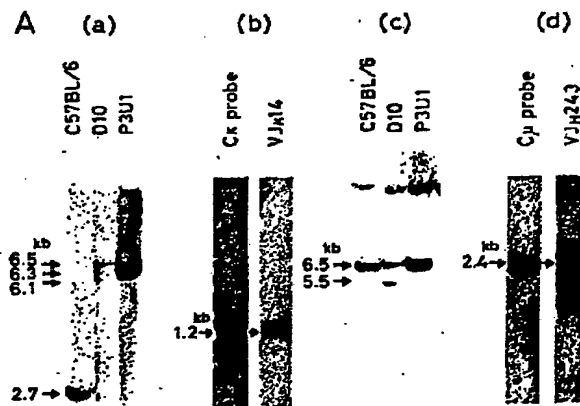
代 理 人 田 中 安

-19-

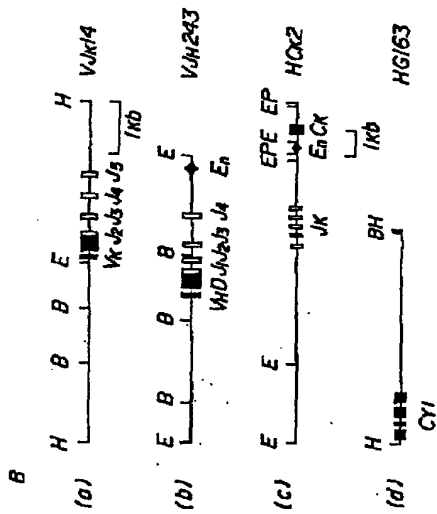
-20-

図面の浄書内容に変更なし

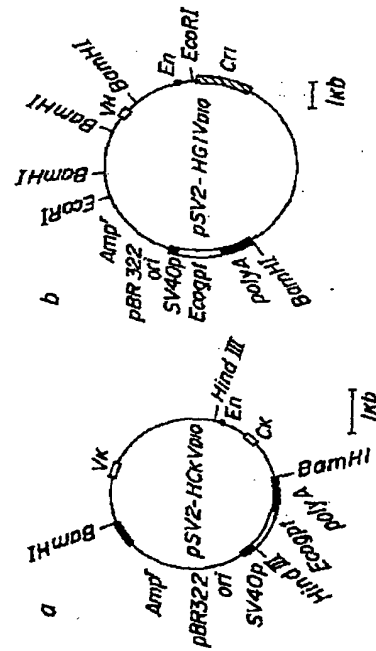
第 1 図 A



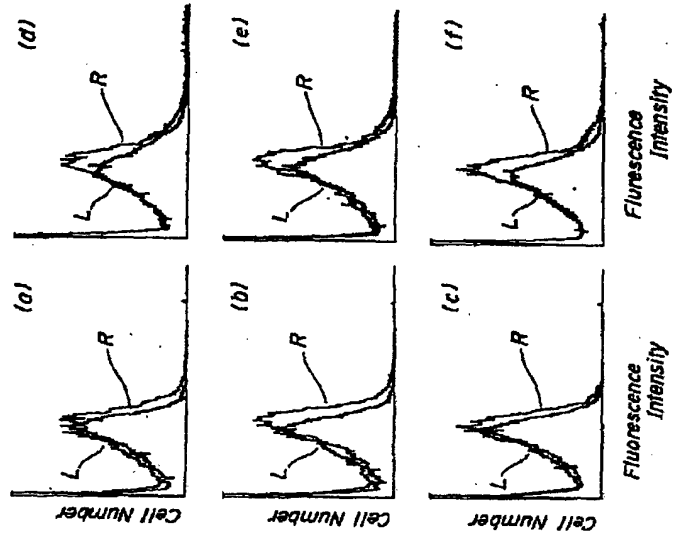
第1図B



第2図

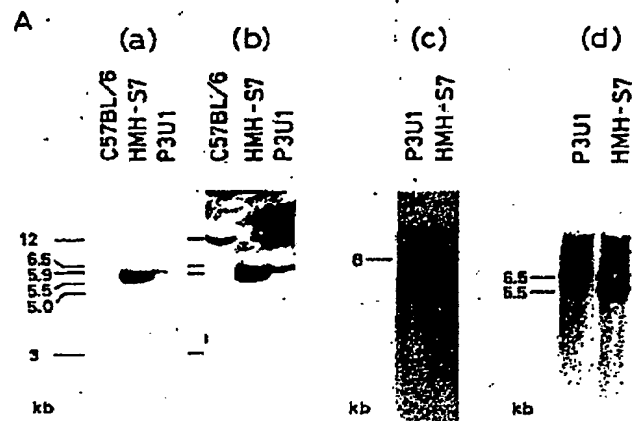


第3図

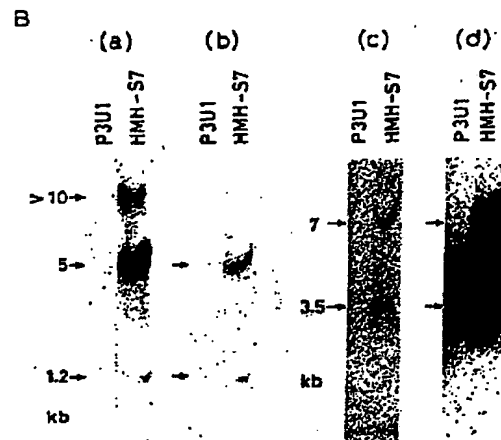




第4図 A



第4図 B



手続補正書

昭和59年9月27日

特許庁長官 志賀 学 殿

## 1. 事件の表示

昭和59年特許願第169370号

## 2. 発明の名称

キメラモノクローナル抗体及びその製造法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都千代田区永田町二丁目5番2号

名 称 新技術開発事業団

理事長 久良知 軍 悟

## 4. 代 理 人 〒105

住 所 東京都港区虎ノ門二丁目5番5号

ニュー虎ノ門ビル5階(電話03-501-1830)

氏 名 8940 弁理士 田 中 宏



## 5. 補正命令の日付 自発補正

## 6. 補正により増加する発明の数 なし

## 7. 補正の対象 図面

## 8. 補正の内容

図面の浄書(内容に変更なし)

1. 特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。
2. 明細書3頁6行目「Milestone」を「Milestone」と補正する。
3. 同頁9行～10行目「パール」を「パール」と補正する。
4. 同5頁16行目「0o8」を「008」と補正する。
5. 同10頁16行目「T. Nanlatia」を「T. Nanlatia」と補正する。
6. 同書同頁19行目「胎子単細胞」を「胎児肝細胞」と補正する。
7. 同書11頁6行目「プラズミド」を「プラスミド」と補正する。
8. 同書同頁14行～15行目「断片を単する」を「断片を単離する」と補正する。
9. 同書12頁9行目「向に制限」を「向は制限」と補正する。
10. 同書15頁2行目「酵素免疫、蛍光抗体法」を「酵素免疫蛍光抗体法」と補正する。
11. 同 16頁8行目「FOS-RPM10 11 640」

手続補正書

昭和59年10月21日

特許庁長官 志賀 学 殿

## 1. 事件の表示

昭和59年特許願第169370号

## 2. 発明の名称

キメラモノクローナル抗体及びその製造法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都千代田区永田町二丁目5番2号

名 称 新技術開発事業団

理事長 久良知 軍 悟

## 4. 代 理 人 〒105

住 所 東京都港区虎ノ門二丁目5番5号

ニュー虎ノ門ビル5階(電話03-501-1830)

氏 名 8940 弁理士 田 中 宏



## 5. 補正命令の日付 自発補正

## 6. 補正により増加する発明の数 なし

## 7. 補正の対象

明細書、特許請求の範囲及び発明の詳細を説明の欄

## 8. 補正の内容

を「FOS-RPMI 1640」と補正する。

12. 同書20頁1行目「PはpvuII」を「PはPvuII」と補正する。

以上

(別 紙)

「特許請求の範囲」

- (1) ヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域からなるキメラモノクローナル抗体
- (2) ヒト以外の動物としてマウスである特許請求の範囲第1項記載のキメラモノクローナル抗体
- (3) ヒト以外の動物としてラットである特許請求の範囲第1項記載のキメラモノクローナル抗体
- (4) ヒト以外の動物の抗体産生細胞から単離した活性な $V_H$ と $V_L$ 遺伝子及びヒトDNAから単離した $O_H$ と $O_L$ 遺伝子を発現ベクターに挿入し、動物培養細胞に導入してキメラモノクローナル抗体を生産することを特徴とするヒト以外の動物由来の可変領域とヒト由来の定常領域とからなるキメラモノクローナル抗体の製造方法
- (5) 抗体産生細胞としてハイブリドーマ、エプ

スタインバールウイルスによる形質転換B細胞またはクローン化B細胞を用いる特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法

- (6) ベクターとしてpSV2-gpt, pSV2-neo, SV40からなる群から選ばれたベクターを使用することからなる特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法
- (7) 動物培養細胞がヒト、サル、マウス等の動物に由来するリンパ腫、腎細胞、L細胞、OOS細胞、HeLa細胞の何れか一種を使用する特許請求の範囲第4項記載のキメラモノクローナル抗体の製造方法